

学校编码: 10384

分类号_____ 密级_____

学 号: 21620071151966

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

深海热液区微生物多样性及一类典型热
液古菌 *Thermococcale* 分离与生理研究

Microbial diversity in hydrothermal vent &t Isolation and
characterization of *Thermococcale* from hydrothermal vent

时圣民

指导教师姓名: 肖 湘 研究员

专 业 名 称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2010 年 04 月

论文答辩时间: 2010 年 06 月

学位授予日期: 2010 年 06 月

答辩委员会主席: 陈亮 教授

评 阅 人: _____

2010 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一部分：前言	1
1.1 热液生态系统的研究进展.....	1
1.1.1 深海热液的类型及分布.....	2
1.1.2 热液生态系统的特点.....	5
1.1.3 热液微生物的研究进展.....	6
1.1.4 热液生态系统的研究意义.....	8
1.2 海洋微生物分子生态学研究进展	9
1.2.1 海洋分子生态学发展简史.....	9
1.2.2 海洋分子生态学相关研究计划.....	10
1.2.3 海洋微生物分子生态学的研究热点.....	11
1.3 超高温古菌的研究概述	20
1.4 本论文研究的思路、目的及意义	25
第二部分：热液系统微生物群落结构的研究.....	26
2.1 材料与方法.....	26
2.1.1 研究材料.....	26
2.1.2 研究方法.....	27
2.2 结果与分析.....	30
2.2.1 东太平洋 6 个位点烟囱体细菌群落结构.....	30
2.2.2 热液烟囱体细古菌群落结构分布特点.....	40
2.2.3 西南印度洋 A 区细菌、古菌多样性分析.....	45
第三部分：超高温嗜热古菌分离、培养及理化性质的初步研究	49
3.1 材料与方法.....	49
3.1.1 研究材料.....	49
3.1.2 实验基本方法.....	52

3.2 结果与分析.....	56
3.3 Pyrococcus sp.CH1 常压下存活实验（Survival Experiment）.....	64
3.3.1 Pyrococcus sp.CH1 背景介绍及该实验意义.....	64
3.3.2 试验流程.....	65
3.3.3 实验结果.....	65
讨论与分析	69
总结与展望	71
总结	71
展望	72
参考文献	73
致谢	77

Contents

Chinese Abstract	I
English abstract	II
ChapterI Introduction	1
1.1 Histroy of the hydrothermal vent research.....	1
1.1.1 Kinds and distribution of deep-sea hydrothermal vent	2
1.1.2 Characters of hydrothermal vent ecosystem	5
1.1.3 Reserch progress in hydrothermal vent microbes	6
1.1.4 The research significance of hydrothermal vent	8
1.2 Research progress in marine molecular microbial ecology	9
1.2.1 Histroy of development in marine molecular microbial ecology	9
1.2.2 Research plans in molecular microbial ecology	10
1.2.3 Research focus in molecular microbial ecology	11
1.3 Reserch overview of hyperthermophiles	20
1.4 Purpose and significance of this reserach	25
ChapterII Research on microbial community structure in hydrothermal system	26
2.1 Materials and methods	26
2.1.1 Research materials	26
2.1.2 Research methods	27
2.2 Reseults and analysis	30
2.2.1 The bacterial community structure of chimineys in 6 sites of EPR	30
2.2.2 The distribution of archaeal community structure in hydrothermal vent chimineys	40
2.2.3 Diversity of bacteria and archaea in Sothwest Indian Ridge	45
ChapterIII Research on the isolation,culture and chemicophysical properties of hyperthermophiles	49

3.1 Materials and methods	49
3.1.1 Research materials	49
3.1.2 Some basic experimental methods.....	52
3.2 Results and analysis	56
3.3 Survive under atmospheric pressure of Pyrococcus sp.CH1	64
3.3.1 Background of Pyrococcus sp.CH1 and the significance of this experiment.....	64
3.3.2 Process of experiment.....	65
3.3.3 Results	65
Analysis and discussion	69
Conclusion and prospect	71
Conclusion.....	71
Prospect.....	72
Reference	73
Acknowledgment	77

摘 要

深海热液口是地球深部和表层的结合处,是研究地球内部物质的最佳窗口之一。其微生物群落代谢类型丰富,一些类群被认为代表生命最古老的形式。

Pyrosequencing 技术以一种新兴的测序技术。与传统的克隆文库技术相比该技术具备同时对大量样品进行测序分析的能力,具有大通量、低成本、适时、快速、直观等优点,因此该技术近期被引入到微生物生态学中。

本文尝试从环境基因组及微生物纯培养两个角度探索热液生态系统。通过 Pyrosequencing 的手段全面分析不同海区热液环境微生物多样性,对东太平洋海隆 EPR 6 个不同位点的热液系统烟囱体以及西南印度洋 A 区热液喷口采集所得的烟囱碎片和沉积物共 10 个样品为研究材料展开了全面的研究和分析。同时本文还采用传统的微生物纯培养的方法试图去分离热液环境中特有的典型古菌 *Thermococcus*, 所用的到富集样品为采自东太平洋海隆 3 个热液位点烟囱体和来自于大西洋中脊 MAR 的 Snake Pit 位点的烟囱。本论文最终成功分离得到了纯培养的 *Thermococcus* 菌株并开展了初步的理化性质的测定,这对人们对深海热液系统的研究和超高温微生物资源的获取都具有重要的意义。

同时本文还研究了迄今为止唯一一株极端嗜压的超高温古菌 *Pyrococcus* sp.CH1 的在常压下“存活实验”(survival experiment)。实验结果显示:极端嗜压嗜热古菌 *Pyrococcus* sp.CH1 在低温、厌氧的条件下可以在常压下存活较长时间。这为极端嗜压微生物的短期保藏以及后期进行的遗传操作打下了坚实的基础。另外,该实验也为我国深海样品的采集、保存以及采样仪器的改善、研制提供了理论依据。

关键词: 深海热液口、焦磷酸测序、超高温古菌

Abstract

Hydrothermal vent is the binding sites between surface and the deep earth. It's one of the best materials to study the interior earth. There are abundant of metabolic types in microbial community in vent and some of the types are considered to be the representative of the oldest forms of life.

Pyrosequencing technology is a new sequencing method to analyze the diversity of microbial community. Compared with the traditional cloning library method, Pyrosequencing technology is fast, large flux and low-cost, so recently this technology has been introduced to microbial ecology.

We tried to study hydrothermal ecosystem on two kinds of perspectives: environmental genome and traditional microbe pure culture method. We studied 6 different hydrothermal vent chimneys in EPR and 4 other sediment samples in EPR and MAR by using pyrosequencing technology. At the same time, we tried to isolate *Thermococcus* strains which are the typical microbe in hydrothermal vent system by the traditional microbe pure culture method. Finally, we succeed to obtain several *Thermococcus* strains. Our results are significant for investigating deep-sea hydrothermal vent system and obtaining hyperthermophile resources.

We also observed the survival experiment of the *Pyrococcus* sp.CH1 under atmospheric pressure. Our results showed that: at low temperature and anaerobic conditions, CH1 can survive for a long time under atmospheric pressure. Our result is significant for the preservation of obligate piezophilic archaeon and it can also provide a theoretical basis for deep-sea sample collection and the improvement of Deep sea sampling equipment.

Keywords: Hydrothermal vent; Pyrosequencing; Hyperthermophiles

第一部分：前言

1.1 热液生态系统的研究进展

海底热液系统是 20 世纪自然科学界最重大的发现之一，也是国际地球科学和生命科学研究的热点和前沿之一。1948 年瑞典科学家利用“信天翁号”（Albatross）科学考察船在红海中部的 Atlantis II 深渊附近发现了红海海底存在着高温高盐的异常现象，第一次暗示了海底热液活动的存在^[1]。随后的国际印度洋科学调查活动，则直接在沿红海北部扩张中心分布的特定盆地内探测到了层叠状的高温高盐溶液及多金属软泥^[2]。1977 年，美法两国科学家乘“Alvin”号在东太平洋海隆（北纬 21°左右）厄瓜多尔西部加拉帕戈斯火山口附近进行海底热泉考察时，首次意外地发现，在水深 2500~2700m 海底的现代热液喷溢口周围存在许多长柱状、短柱状的“黑烟囱”或“白烟囱”。更令人感觉不可思议的是，在这些温度高达 300~350℃，的“烟囱”周围都存活着长管虫、蠕虫、蛤类、贻贝类，还有蟹类、水母、藤壶等特殊的生物群落。有人将这样五彩缤纷、生机勃勃的海底生物世界称为海底“生命绿洲”。进一步研究证明，喷溢口周围大量微生物体内细胞有一种特殊的“嗜热基因”，它们通过对硫化物的分解代谢为其它生物的生存提供丰富的饵料。这种依靠地球内源能量支持，在深海黑暗和高温的环境下，通过化合作用生产有机质的“黑暗食物链”的发现使人类对深海环境以及生物圈有了更进一步的了解。这一激动人心的发现打破了科学家以往对于生命生存极限的认识，对于热液生命的探索深部生物圈的研究也由此拉开了序幕。

20 世纪 80 年代以来，基于快速扩张的洋中脊热流值高更有利于发育热液活动的推测，寻找海底热液活动的工作主要集中在 EPR（东太平洋洋中脊）地区，并相继发现了著名的胡安得富卡洋脊^[3]（Juan de Fuca Ridge, JDFR）和瓜伊马斯海盆^[4]（Guaymas Basin, GB）2 处热液活动集中区域。值得一提的是，在此期间研究人员又一次意外的在慢速扩张 TAG 处新发现了蛇坑（Snake Pit）、断岭（Broken Spur）及幸运山岭（Lucky Strike）3 处热液活动点。

21 世纪初，Bach 等^[5]在超慢扩张的西南印度洋脊（South West Indian Ridge, SWIR）也发现了热液活动，Dmonds 等在超慢扩张的北冰洋嘎科尔洋脊（Gakkel Ridge）也发现了 9~12 个独立的热液活动点。除了洋中脊外，研究人员在其它地区同样发现了热液活动的踪迹，如 Kelley 等^[7]发现的“迷失的城市”（The Lost

City field) 热液活动点位于远离大西洋洋脊 15 km 处。此外, 西太平洋的马里亚纳海沟、冲绳海槽以及科美迪克火山弧 (Kermadec volcanic arc)^[8]等地也发现了大范围的热液活动区。

1.1.1 深海热液的类型及分布

自从上世纪 70 年代末首次发现海底热液系统以来, 科学家们便一直致力于更多新的热液喷口的发现, 目前这种大规模的、有系统、有组织的搜寻活动已经覆盖了全球范围内的扩张中心。经过30 多年系统的探索 and 发现, 现已在全球洋底不同扩张速度和地质构造的板块活动地带发现了大约280 处活动的热液喷口, 它们主要集中在红海、大西洋中脊 (MAR) 、东太平洋隆起 (EPR) 、西南印度洋中脊 (SWIR) 、西太平洋削减带等5大区域^[9 10 11 12 13]进行统计, 可以发现热液喷口的分布极不均衡, 大约近半数的热液喷口 (118 个) 是在人们重点调查的东太平洋隆 (East Pacific Rise) 地区发现的, 在大西洋中脊 (MAR) 地区也发现约五分之一的热液喷口。相比之下, 沿着一段包括了大西洋中脊 (MAR) 南端、整个印度洋脊 (含西南, 东南和中印度洋脊)、太平洋南极洋中脊和东太平洋隆 (EPR) 位于38°S 以南的一段连续的, 长约30000km 的洋脊范围内, 仅有2 处活动的热液喷口获得了证实, 这2 个热液喷口均靠近印度洋的三连点附近 (Rodriguez Triple Junction)。

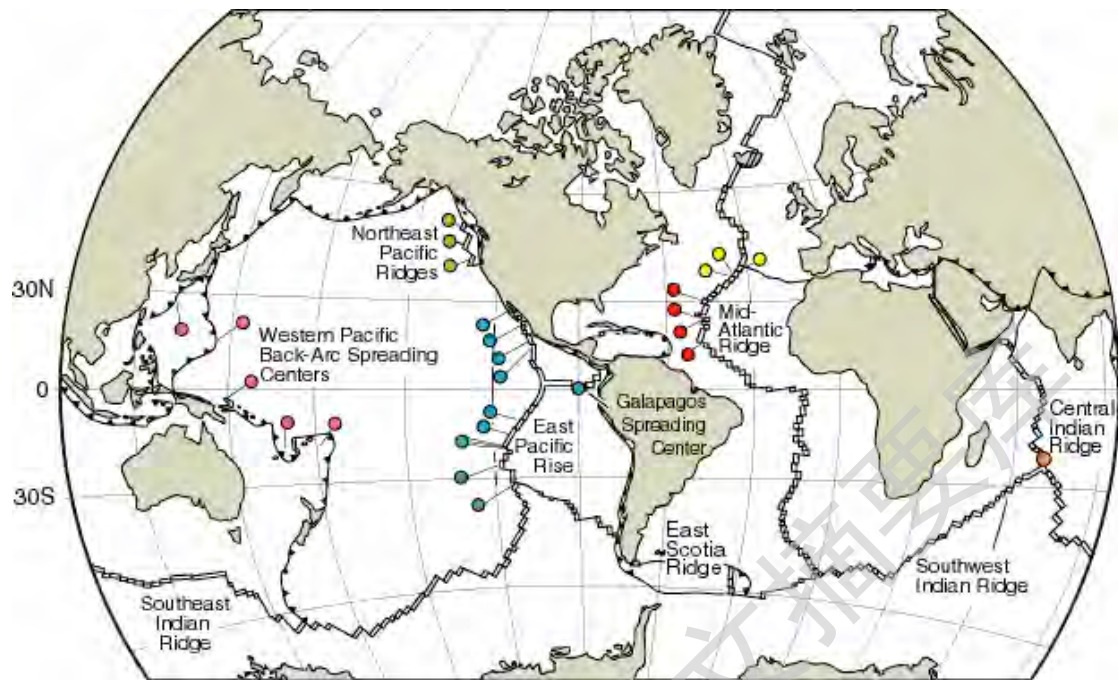


图1-1：世界上主要的热液活动区域分布图 (Van Dover Science 2002)

2008年，William Martin 等科学家在认真研究、分析了已经发现的热液口基础上撰文指出^[14]，目前的热液口可以分为两种类型即：黑烟囱类型（Black smokers）和Lost City 类型(LCHF)。

黑烟囱的代表如Faulty Towers Complex（图1-2a），一般直接位于1-3 千米深的岩浆层之上^[15]。黑烟囱的底部基质主要以玄武岩为主。同时于2000 年，一类以高达60 米的碳酸盐烟囱体为特征的喷口系统在大西洋脊的超基性海底被发现^[16 17]。这个喷口系统被命名为Lost City 热液场，其超基性基岩与地球初期原始海洋火山岩喷发时的化学组成类似，因此Lost City 流场与生命起源可能具有非常特殊的联系。

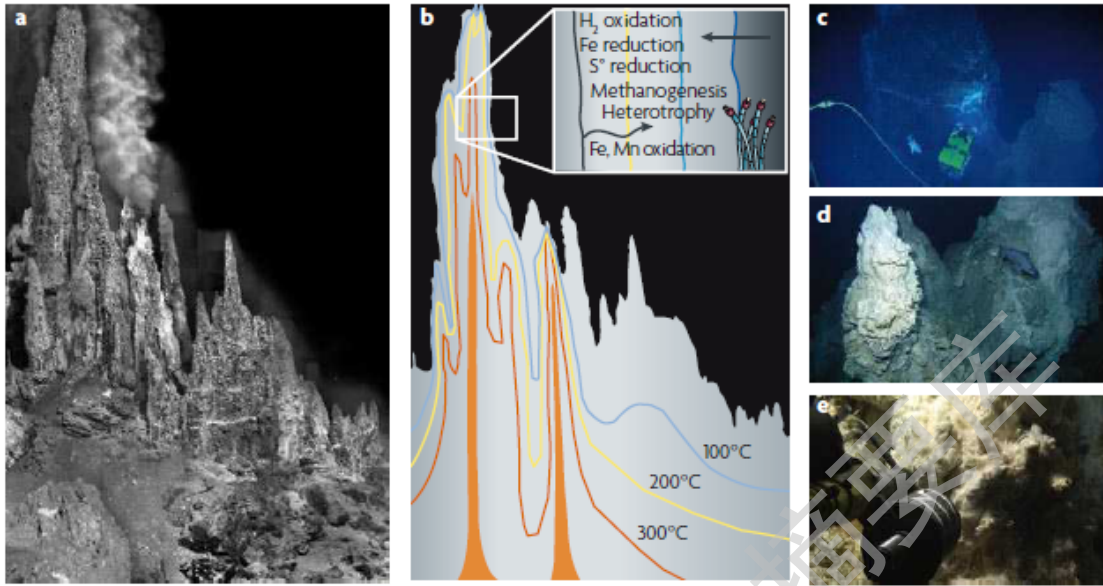


图1-2: 两种典型的热液系统 黑烟囱、Lost City

黑烟囱：底部基岩以玄武岩为主的硫化物烟囱体中，烟囱喷口喷发着酸性的($\text{pH} \sim 2-3$)、高温的(可以高达 405°C)并且富含溶解的过渡金属如 Fe(II) ， Mn(II) 的热液流体。由于黑烟囱流场是由火山喷发所致，因此这些热液流体一般含有高含量的底部岩浆 CO_2 ($4-215 \text{ mM/kg}$)， H_2S ($3-110 \text{ mM/kg}$)，同时还有不同含量的生物或地质成因的 CH_4 ($0.05-4.5 \text{ mM/kg}$)。从烟囱内部到与低温含氧的海水交汇的烟囱外部，烟囱体上存在很大的温度范围(图1-2b)。黑烟囱系统中溶解的气体和金属为微生物群落提供最初能源并由此作整个生态系统食物链的基础。

Lost City 系统：Kelley在大西洋脊发现的Lost City 热液场(LCHF)与黑烟囱差别很大。离轴型(off-axis vents)的喷口位于距洋中脊扩张区域几千米的地方。其流体通过地壳进行循环，温度可以达到 200°C ，但是水却不会与熔浆紧密接触^[18]。该热液场深部的热液地球化学作用主要由蛇纹石化反应所控制，其喷出的热液流体为碱性， $\text{pH} \sim 9-11$ ，温度介于 $40-91^\circ\text{C}$ ，富含 H_2 （可以达到 15 mmol/kg ）和 CH_4 （ $1-2 \text{ mmol/kg}$ ）和其他低分子量的碳氢化合物，然而 CO_2 的含量却非常低（ $<1 \text{ mmol/kg}$ ）^[16 19 20]。与多数喷发黑烟的高温热液相比，这些流体中金属以及硅的含量很低，相反却富含 Ca_{2+} （可以达到 30 mmol/kg ），

与海水的混合的结果就是产生了大型碳酸盐岩型的烟囱体。 ^{14}C 同位素计年结果表明Lost City 的热液活动至少已经持续了30,000 年^[18]，然而最近的铀-钍的

计年结果表明喷口已经活动了大约100,000 年^[21]。Lost City 热液场的发现，大大的改变了人们对海底热液系统形成过程及其控制因素的思维。

1.1.2 热液生态系统的特点

热液区域环境条件特殊，存在极高的海水压力（可达300atm），喷口处更有高达400℃的海水温度并存在急剧的温度变化（4-400℃）。此外，这里充满了重金属、硫等有毒化学物，而且属于完全的黑暗地带。在洋中脊地带，海底隆起形成的火山占据了全球火山的2/3以上，因此成为热液口的集中分布区。热液口为上升热液流及深海氧化海水的区间带。热液流的形成过程大致可分为三个阶段：首先，深海冷的海水由地壳裂缝处渗入并被逐步加热。由于热力学作用，海水中 Mg^{2+} 由海水析出进入岩石；相反，伴随着该过程中酸类物质的形成，岩石中的大量离子被溶解并合并入了热液流中。海水中的 SO_4^{2-} 离子在该过程中也逐步丧失，沉积形成硫酸钙矿物或被还原形成硫化氢。第二个阶段，热液流在热源附近被加热至最高温，进入其反应带，通过剧烈的反应以及许多离子的参与达到一个平衡体系，形成了热液流的物质组成。热液流物质的组成取决于几个方面的因素，包括温度、压力、海水组成、岩石组成、水岩比例以及反应时间等。第三阶段为热液流的上升阶段。在该过程中，热液流由于压力作用，向低压裂缝处喷出。在该过程中，热液流仍然与岩石发生着一定的反应。此外，由于与岩石的热交换或者上升过程中海水的冷却作用，二级产物如硫化物等会逐步形成，因此也在一定程度上改变了热液流的物质组成（图1-3）。

上升的热液流在与周围海水作用后，热液流中的物质会在顷刻间析出形成浓密的颗粒状物质，这就是我们所说的黑烟囱。这些颗粒物基本上是由硫化物（如磁黄铁矿FeS、闪锌矿ZnS等）以及硫酸盐矿物（硫酸钙、硫酸钡等）组成。形成的矿物因此沉积在烟囱壁上，形成烟囱的结构物质，或者分散在海水中，成为这里生命的物质基础。

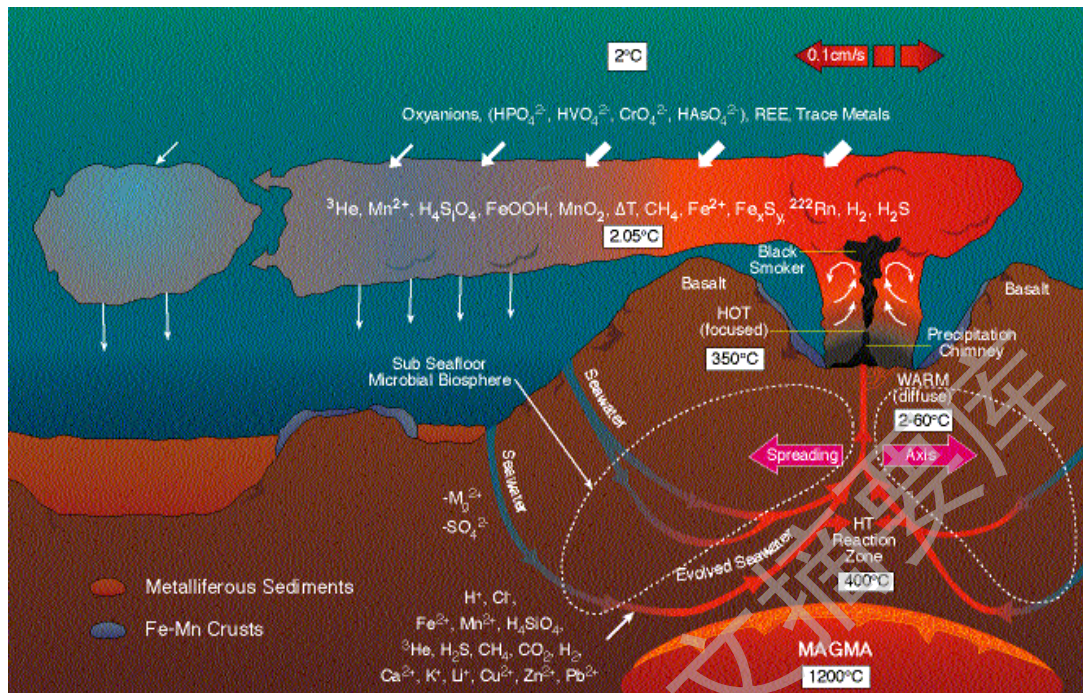


图1-3: 热液生态系统下的物质变化规律

研究表明深海热液口区的生物群落丰富，包括有丰富的微生物、大型的蛤贝类、大型管状蠕虫以及鱼类等。并且热液喷口生物群落的分布有一定的规律，在单个喷口区不同种群的分布主要受水温控制，一般围绕喷口呈环带状分布^[22]。代表物种包括管状蠕虫类、蛤类、贻贝类等双壳类、腹足类和鱼、虾和蟹等较大的生物以及多毛纲蠕虫动物，在这些生物体内还存在着共生微生物。

1.1.3 热液微生物的研究进展

海洋微生物学研究最早可追溯于 1875 年，Pflügere 第一次确认了海鱼体内存在发光细菌。1884 年，Certes 在 Talisman 探险活动中，第一次采集到深海沉积物和深海海水样品，并从 100 个海水样品中发现了 96 个耗氧细菌。1894 年，Bernhard Fischer 采用可培养微生物的手段(改良的营养琼脂培养基)，第一次证实海洋中存在“土著的”细菌^[23]。1961 年，国际海洋微生物学讨论会的召开，标志着以海洋细菌为主要内容的海洋微生物学已成为独立的学科。

随着海洋微生物培养技术、电子荧光显微技术、分子生物学技术等相关技术的发展，目前发现的海洋微生物种类已越来越多，所涉及的细菌类群包括变形细菌(又称紫色细菌，Proteobacteria)菌群，革兰氏阳性菌菌群。纤维菌/屈挠杆菌/拟杆菌群(CFB 类群，*Cytophaga/Flexibacteria/ Bacteroides*)。浮霉状菌群

(*Planctomycetales*)、疣微菌群(*Verrucomicrobiales*)、螺旋体(*Spirochaeta*)、绿色非硫细菌(*Green non-sulfur bacteria*)、蓝细菌(*Cyanobacteria*)等。而通过分子生态学的手段,还发现很多不可培养细菌的类群,包括 *AC1*、*BRC1*、*NKB19*、*OD1*、*OP1*、*OP3*、*OP5*、*OP8*、*OP9*、*OP10*、*OP11*、*Poribacteria*、*SBR1093*、*SPAM*、*TM7*、*WS1*、*WS3*、*WS5* 等^[24]。而海洋真菌类群主要分布在子囊菌纲、半知菌纲、担子菌纲(*Basidiomycota*)、酵母等内^[25-26]。海洋古菌类群包括四个类群, 广古生菌(*Euryarchaeota*)、泉古生菌(*Crenarchaeota*)、原古生菌(*Korarchaeota*)和微古菌门(*Nanoarchaeota*)。其中大多属于不可培养古菌类群,主要包括以下几类: *Marine Benthic Groups A*, *Marine Benthic Groups D* (*MBG-A*, *MBG-D*)、*Marine Benthic Group B* (*MBG-B*)、*Ancient Archaeal Group* (*AAG*)、*Marine Hydrothermal Vent Group* (*MHVG*)、*Miscellaneous Crenarchaeotic Group* (*MCG*)、*Marine Group I* (*MG-I*)、*South African Goldmine Euryarchaeotal Group*(*SAGMEG*)、*Terrestrial Miscellaneous Euryarchaeotal Group*, *Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeotal* (*DHVE-6*)等^[27]。此外,科学家们发现,病毒广泛地存在于海水、海洋动物、藻类以及各种微生物中。它们在海洋生态、生物进化中起着重要作用,它们在营养、生物地球化学循环中起重要作用。目前,第一个海洋来源的病毒 *Roseophage* 的基因组序列(约 40kb)现已被测定^[28]。

热液口区域的微生物的分布与热液口区域的地球化学条件息息相关。在热液口生态中,热液口的化能自养微生物是该生物群落食物链的初级生产者,最初以 H_2 浓度控制着其无机自养代谢。热液生态系统独特的物化梯度条件支撑起了具有独特生理特性的多种微生物群落,包括各种极端嗜热、嗜冷、嗜压微生物;化能无机自养、异养微生物以及严格厌氧和微需氧的微生物等^[29-31]。面对这些恶劣的外部生存环境,这里的生物形成了独特的身体结构及代谢机制来适应这里的环境条件。研究表明,在热液系统中存在着 7 大类主要生理代谢:碳相关代谢(*Carbonoxydotrophs*)如甲烷代谢,异养硫酸盐产生(*Heterotrophic sulfidogens*),异养硫酸盐还原(*Heterotrophic SRP*),异养硝酸盐氧化/还原(*Heterotrophic nitrate/O₂*),硫氧化(*Sulfur oxidizers*),铁氧化(*Fe oxidizers*),氨氧化(*Oxic ammonia oxidizers*)。化能合成生产为该群落提供最初的能量和食物,是该群落食物链的基础,热液群落中的其他动物都是依靠这些微生物合成的有机物

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库